

STUDI FILOGENETIK IKAN KARANG GENUS PSEUDOCROMIS DAN PICTICROMIS DI PERAIRAN INDO-PASIFIK

Analisis Finansi Suryo Twindiko¹, Diah Permata Wijayanti², Ambariyanto³
email : twindiko@gmail.com

*Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
 Jl. Prof. Sudarto, SH Tembalang Telp./Facs. (024) 7474698 Semarang – 50275*

Abstrak

Indo-Pasifik merupakan kawasan perairan yang memiliki keanekaragaman yang tinggi. Salah satu keanekaragaman tertinggi di perairan Indo-pasifik adalah spesies ikan karang. *Pseudochromis* adalah salah satu spesies ikan karang yang tersebar luas di seluruh perairan Indo-Pasifik. Di dalam suatu kawasan yang memiliki keanekaragaman jenis melimpah, terdapat banyak spesies yang bersaing untuk sumber daya yang terbatas dalam bertahan hidup. Perbedaan kondisi lingkungan dapat mengakibatkan terjadinya perubahan karakter morfologi, anatomi dan filogenetik dari suatu populasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan Genus ikan *Pseudochromis* di sebagian perairan Indo-Pasifik dengan melihat perbedaan kedalaman dan perbedaan warna. Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksploratif. Sedangkan untuk analisis molekuler melalui ekstraksi DNA dilanjutkan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), elektroforesis, sekuensing dan yang analisis filogenetik. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa pohon tersebut terbagi dalam lima clade dengan jarak genetik terdekat 0% dan jarak genetik terjauh 16,4%. Perbedaan kedalaman dan warna pada ikan tersebut tidak terlalu signifikan sebagai petunjuk dalam menentukan spesies baru.

Kata Kunci : *Pseudochromis*, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Pohon Filogenetik, Locus 16S, Locus Control Region

Abstract

Indo-Pacific Ocean is one of ecosystem with its wide range diversity. One of the highest diversity in Indo-Pacific waters is its species of reef fish. *Pseudochromis* is one of the reef fish species that is widespread throughout the Indo-Pacific Ocean. Marine ecosystem having an abundant diversity of marine species usually occurs a competition to survive. Spatial variation leading to different environmental condition can affect the morphology, anatomy, and phylogenetic of population. It causes critical changes of intra-species character. This study aims to comprehend the genetic relationship of reef fish from the genus *Pseudochromis* in part of the Indo-Pacific Ocean by looking the difference of the ocean depth and color difference. The method used in this study was explorative. For the molecular analysis was using DNA extraction followed by *Polymerase Chain Reaction* (PCR), electrophoresis, sequencing and phylogenetic analysis. Results of the study indicated that the phylogenetic tree was divided into five clade, with the closest genetic distance was 0% and the farthest was 16.4%. The depth and color difference of the fish was not very significant as a guide in determining the new species.

Keywords : *Pseudochromis*, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Phylogenetic Tree, Locus 16S, Locus Control Region

Pendahuluan

Indo-Australia Archipelago (IAA) memiliki keanekaragaman jenis ikan karang yang paling kaya secara biologis di dunia. IAA terletak di Indo-Pasifik dan meliputi sekitar dua pertiga

dari daerah tropis khatulistiwa. Perairan Indo-Pasifik meliputi perairan Philipina, Indonesia dan Australia Barat Laut. Kawasan ini merupakan daerah tempat ditemukan tingkat keanekaragaman tertinggi untuk spesies karang, ikan karang, gastropoda, dan beberapa kelompok

krustasea (Bellwood dan Meyer, 2009). Wilayah Perairan Indo-Pasifik ini merupakan salah satu tempat di dunia yang masih menyimpan specimen yang belum teridentifikasi secara ilmiah dan banyak kemungkinan ilmuwan menemukan spesies yang belum dijelaskan oleh ilmu pengetahuan. Salah satu keanekaragaman tertinggi di perairan Indo-Pasifik adalah spesies ikan karang (Allen, 2007), seperti Dottybacks (Famili Pseudochromidae) yang hidup pada daerah terumbu karang di seluruh Indo-Pasifik.

Genus *Pseudochromis* dan *Pictichromis* merupakan spesies asli wilayah IAA. Spesies *Pseudochromis litus* pertama kali dijelaskan pada tahun 1998 melalui analisis 5 individu yang dikumpulkan dari Pulau Komodo dan Turo Liu Point di Indonesia. Persebarannya terbatas dari Laut Banda dan Flores dan mungkin lebih ke utara ke perairan Filipina. *P. litus* yang digunakan untuk menggambarkan spesies adalah yang ditemukan di lokasi terisolasi di kedalaman 42 meter, 65 meter dan 77 meter. Ikan tersebut memiliki kepala dan badan abu-abu kekuningan sampai kehijauan dan pada kedalaman tertentu menjadi merah muda pucat dengan bagian perut berwarna putih dan abu-abu kebiruan sampai abu-abu kebiruan gelap pada ekor (Gill dan Randall, 1998). Adanya perbedaan dalam morfologi dan rentang kedalaman beberapa individu *P. litus*, diduga ada lima ordo tambahan yang belum ditemukan. Spesies ini sementara disebut *P. rutilus* berdasarkan perbedaan morfologi yang tampak nyata (Allen, 2007).

Karakter morfologi telah lama digunakan dalam banyak penelitian filogenetika. Perkembangan teknik-teknik di dalam biologi molekuler semakin pesat, seperti *polymerase chain reaction* (PCR) dan *sequencing* DNA. Penggunaan sekuen DNA dalam penelitian filogenetik telah meningkat pesat dan telah dilakukan pada semua tingkatan taksonomi, misalnya famili, marga, dan spesies. Filogenetik molekuler mengkombinasikan teknik biologi molekuler dengan statistik untuk merekonstruksi hubungan filogenetika (Hidayat dan Pancoro, 2008). Filogenetika merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan dalam sistematika untuk memahami keanekaragaman makhluk

hidup melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan (*phylogenetic relationship*).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan genus ikan *Pseudochromis* dan *Pictichromis* di sebagian perairan Indo-Pasifik dengan melihat perbedaan kedalaman dan perbedaan warna.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni – Agustus 2011 di Laboratorium Biomedika, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. Sedangkan untuk sekuensing dilakukan di UC Berkeley DNA Sequencing Facility. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi pengambilan sampel ikan karang dan analisis molekuler.

1. Pengambilan Sampel

Sampel dikumpulkan menggunakan bahan sulfat quinaldine, rotenone, atau minyak cengkeh dengan bantuan peralatan snorkeling atau scuba tergantung pada kedalaman. Sampel yang diperoleh difoto terlebih dahulu kemudian diambil siripnya untuk analisis genetik. Untuk memperoleh spesimen yang cukup untuk analisis genetik, terutama spesimen yang sangat kecil biasanya dibutuhkan pemotongan 1/3 sampai 1/2 bagian posterior dari tubuh sampel. Spesimen yang telah diawetkan kemudian digunakan untuk mengetahui diagnosa fitur morfologi dari masing-masing keturunan genetik yang ditemukan (Baldwin *et al.*, 2011).

2. Analisis Molekuler

a. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan larutan *chelex* (Walsh *et al.*, 1991) Jaringan sampel diambil sebanyak + 2 mm (sebesar titik) dengan menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam tube yang berisi larutan *chelex*. Sebelum dan sesudah jaringan diambil pinset dicelupkan ke dalam ethanol 96% dan dibakar dengan api bunsen. Larutan *chelex* yang sudah diisi jaringan, divortex dan disentrifuge selama + 20 detik,

kemudian dipanaskan dalam *heat blok* dengan suhu 95°C selama + 45 menit. Setelah dipanaskan, tube kembali divortex dan disentrifuge selama + 20 detik. Larutan ekstraksi siap digunakan untuk amplifikasi.

b. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Metode PCR dilakukan pada semua sampel yang telah diekstraksi dengan membuat tiap reaksi yang terdiri dari: kit *Platinum® PCR SuperMix* (berisi buferPCR, dNTP, enzim *Taq DNA polymerase*), aquabides steril, primer (CRA)

forward 5' TTCCACCTCTAACTCCCA AAGCTAG_3' dan primer (CRE) *reverse* 5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG_3' (Lee *et al.*, 1995) untuk amplifikasi mtDNA Control Region dan primer (16S aR) *forward* 5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT_3' dan primer (16S bR) *reverse* 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T_3' (Palumbi, 1996) untuk amplifikasi 16S rDNA.

Amplifikasi dilakukan sebanyak 38 siklus, yaitu predenaturasi 80°C (10 detik) dan 94°C (15 detik), denaturasi 94°C (30 detik), annealing 48°C (30 detik), extension 72°C (45 detik), post extension 72°C (5 menit).

c. Elektroforesis

Setelah dilakukan PCR, maka untuk mengetahui hasil PCR berhasil atau tidak dapat dilihat dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1%. Langkah awal yang dilakukan dalam elektroforesis ini adalah pembuatan 1% agarosa. 1 gram agarosa dimasukkan erlenmeyer ditambahkan 100 mL TAE 1X. Kemudian dipanaskan di dalam mikrowave, jika sudah larut merata ditambahkan 4 uL EtBr. Gel agarosa dituangkan di cetakan yang sudah dipasang sisir pembuat sumur dan didiamkan selama 30 menit.

Dalam proses elektroforesis, sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur (*well*) pada gel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga,

dan listrik dialirkan kepadanya. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Asam nukleat bergerak menuju elektrode positif, hal tersebut disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gulafosfat yang dimilikinya. Untuk menjaga agar laju perpindahan asam nukleat benar-benar hanya berdasarkan ukuran (yaitu panjangnya), zat seperti natrium hidroksida atau formamida untuk menjaga agar asam nukleat berbentuk lurus. Sementara itu, protein didenaturasi dengan deterjen (misalnya natrium dodesil sulfat, SDS) untuk membuat protein tersebut berbentuk lurus dan bermuatan negatif (Bruce *et al.*, 2002).

Mesin dipasang pada voltase 200 V dan arus 400 mA selama 15 menit. Setelah selesai, gel diletakkan pada boks UV, selanjutnya lampu UV dinyalakan. Dan terakhir, gel difoto, setelah itu gel dibuang ke dalam boks pembuangan gel yang telah disiapkan. Sampel positif yang mengandung DNA dapat dilihat dengan adanya pita terang pada gel.

d. Sekuensing

Produk PCR yang baik dan memenuhi syarat untuk dilakukan proses sekuensing, dikirim ke Laboratorium UC Berkeley DNA Sequencing Facility.

e. Analisis Filogenetik

Pohon filogenetik diproses menggunakan software MEGA 5.1. Untuk Lokus Control Region digunakan model Hasegawa Kishino-Yano (HKY) dan model Generalized Time-Reversible (GTR) untuk Lokus 16S. Analisa dan penyusunan pohon filogenetik dilakukan dengan metode Maximum Likelihood (Tamura, 2011).

Hasil dan Pembahasan

Hasil analisis pohon filogenetik dari *Pseudochromis litus* (Gambar 1 dan Gambar 2) didapatkan lima clade, yang pertama *P. litus* Raja Ampat satu clade dengan *P. litus* Misool65m, Clade kedua *P. litus* Banda42m dengan *P. rutilus* Banda 65m, Clade ketiga *P. litus* Manawoka dengan *P. litus* Halmahera, Clade keempat *P. andamanensis* Myanmar dengan *P. andamanensis* Bali dan Clade kelima *P. ransonneti* Brunei01 dengan *P. ransonneti* Brunei02.

Apabila dilihat dari pohon tersebut, Ikan Genus *Pseudochromis* menunjukkan kekerabatan yang dekat berdasarkan lokasi ditemukannya. Sehingga kemungkinan besar ikan *P. rutilus* Banda 65m adalah termasuk dalam *P. litus*. Sedangkan untuk spesies *P. ransonneti* terlihat jauh dari Genus *Pseudochromis* yang lain, hal ini kemungkinan karena lokasi ikan tersebut yang terletak di Brunei. Lokasi yang jauh yaitu di sebelah utara perairan Indonesia juga berpengaruh terhadap jarak genetik ikan *P. ransonneti*.

Genus *Pictichromis* terbagi atas dua clade, clade yang pertama *Pc. porphyreus* Brunei, *Pc. diadema* Palawan dan *Pc. diadema* Brunei. Sedangkan clade yang kedua *Pc. paccagnellae* Banda, *Pc. paccagnellae* Banda kedalaman 35 meter dan *Pc. porphyreus* Fakfak-Papua. Jadi terlihat jelas bahwa Ikan Genus *Pictichromis* yang ditemukan di sisi utara Indonesia berada pada satu clade dan yang ditemukan di sisi timur Indonesia juga berada pada clade sendiri.

Analisis filogenetik suatu spesies dapat dilakukan pada karakter morfologi dan gen-gen yang berada di dalam dan di luar tubuh dengan sekuen DNA mitokondria. Penggunaan sekuen DNA mitokondria memperjelas hubungan spesies secara evolusi yang kabur akibat variasi morfologi (Avice, 1994). Sekuen DNA mitokondria memperlihatkan variasi DNA suatu populasi, perubahan breeding suatu individu dan isolasi terhadap populasi tersebut (Liu *et al.*, 2000; Tjong *et al.*, 2007).

Hasil analisis jarak genetik antar spesies dari lokus Control Region dapat diketahui bahwa jarak genetik terdekat adalah 1,2% yaitu pada

spesies *P. litus* Halmahera dengan *P. litus* Manawoka, *P. litus* Misool65m dengan *P. litus* R4, dan *Pc. diadema* Palawan dengan *Pc. porphyreus* Brunei01. Sedangkan jarak genetik terjauh adalah 65,1% yaitu pada spesies *Pc. diadema* Brunei01 dengan *P. coccinicauda* Myanmar (Tabel 1).

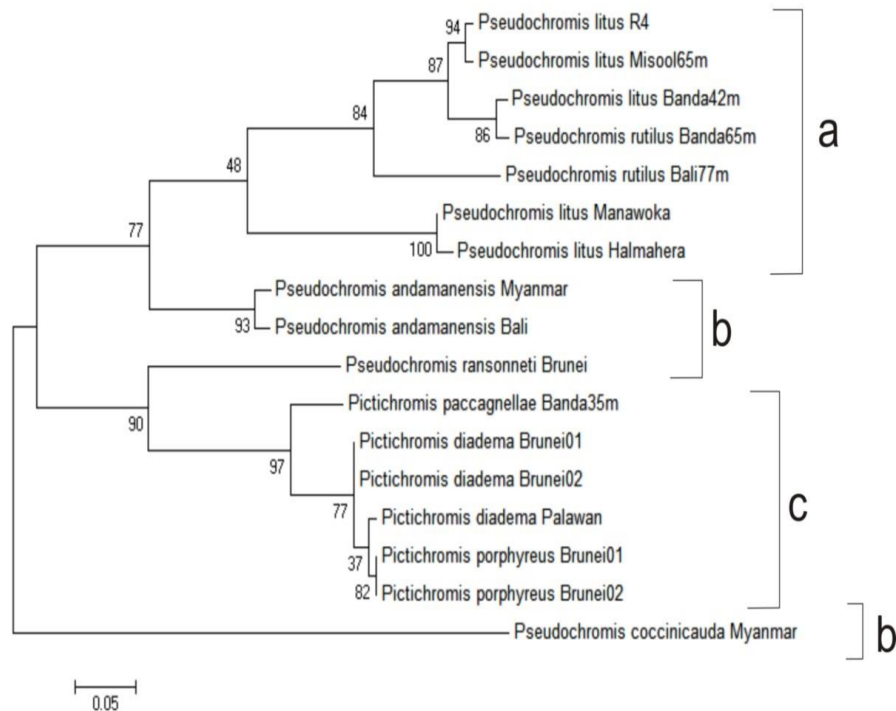
Sementara hasil analisis jarak genetik antar spesies dari lokus 16S menunjukkan bahwa jarak genetik terdekat adalah 0,0% yaitu pada spesies *P. litus* Halmahera dengan *P. litus* Manawoka, *P. litus* Misool65m dengan *P. litus* R4, *P. rutilus* Banda65m dengan *P. litus* Banda42m, *Pc.paccagnellae* Banda35m dengan *Pc. porphyreus* Fakfak, *Pc. diadema* Palawan dengan *Pc. porphyreus* Brunei, *Pc.paccagnellae* Banda dengan *Pc. porphyreus* Fakfak, *Pc.paccagnellae* Banda dengan *Pc.paccagnellae* Banda35m, *Pc. diadema* Brunei dengan *Pc. porphyreus* Brunei, dan *Pc. diadema* Brunei dengan *Pc. diadema* Palawan. Sedangkan jarak genetik terjauh adalah 16,6% yaitu pada spesies *Pc. porphyreus* Fakfak dengan *P. ransonneti* Brunei01, *Pc.paccagnellae* Banda35m dengan *P. ransonneti* Brunei01, dan *Pc.paccagnellae* Banda dengan *P. ransonneti* Brunei01 (Tabel 2).

Mayr (1970) menyatakan bahwa suatu populasi yang memiliki tingkat kedekatan hubungan kekerabatan yang tinggi mempunyai banyak persamaan morfologi, genetik dan dipengaruhi oleh keadaan lingkungan. Persentase sekuen divergen dengan nilai $\pm 2,0\%$ - $3,0\%$ berdasarkan gen 16S rRNA akan mengubah status spesies tersebut, sedangkan nilai 11,0% pada persentase sekuen divergen berdasarkan gen 16S rRNA diindikasikan sebagai spesies baru (Kartavtsev dan Lee, 2006). Berdasarkan grafik jarak genetik dalam penelitian ini, selisih terjauh kekerabatan antara *P. litus* dan *P. rutilus* adalah 2,4% dan yang paling terdekat adalah 0%, jadi *P. litus* atau *P. rutilus* dari sampel yang didapatkan merupakan satu spesies yang sama dengan persentase tidak lebih dari 3% meskipun berbeda kedalaman. Sedangkan antara Genus *Pseudochromis* dan Genus *Pictichromis* jarak genetik terjauh adalah 16,4% dan yang terdekat adalah 11,5%, jadi sudah terlihat benar bahwa keduanya berbeda Genusnya dilihat dari jarak genetiknya yang lebih dari 11%.

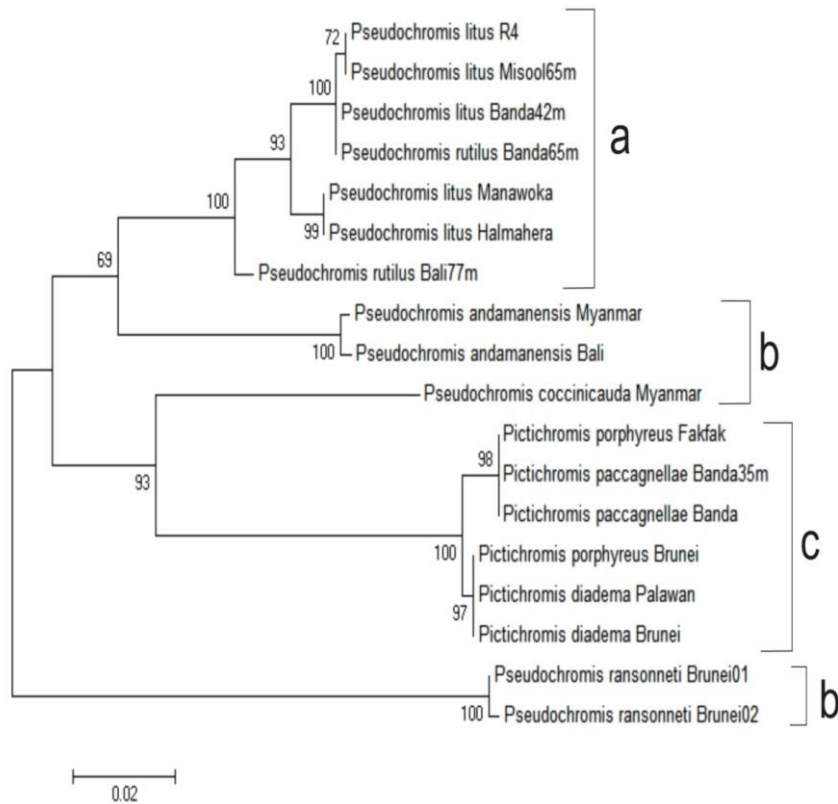
Apabila dilihat dari data tersebut, perbedaan kedalaman dari suatu spesies tidak terlalu signifikan sebagai petunjuk dalam menentukan spesies baru. Perbedaan kedalaman pada ikan Genus *Pseudochromis* tidak berpengaruh terhadap variasi genetik dari ikan tersebut, hal itu dapat dilihat dari jarak genetiknya yang tidak lebih dari 11%. Akan tetapi, adanya sedikit perbedaan warna menunjukkan adaptasi lingkungan ikan tersebut pada habitatnya.

Morfologi warna dapat menunjukkan perbedaan spesies, tetapi tidak sesuai dengan

hasil data genetik yang diperoleh. Sebagai contoh, dari studi terbaru menunjukkan bahwa biota laut yang terdistribusi secara luas dapat memiliki variasi genetik yang tinggi (Barber *et al.*, 2006; Mathews, 2006; Crandall *et al.*, 2008; DeBoer *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2008). Misalnya, seperti yang dijumpai pada *Hypoplectrus spp.* dan kerapu (*Serranidae*), saat ini masih diidentifikasi dari variasi warna, belum dipisahkan menggunakan marker mitokondria (McCartney *et al.*, 2003).



Gambar 1. Pohon Filogenetik *Pseudochromidae* dari Locus Control Region. a). *P. litus*, *P. litus* Nusa Penida, *P. litus* Nusa Penida; b). *P. andamanensis*, *P. coccinicauda*, *P. ransonneti*; c). *Pc. diadema*, *Pc. paccagnellae*, *Pc. porphyreus*.



Gambar 2. Pohon Pohon Filogenetik *Pseudochromidae* dari Locus 16S. a). *P. litus*, *P. litus* Nusa Penida, *P. litus* Nusa Penida; b). *P. andamanensis*, *P. coccinicauda*, *P. ransonneti*; c). *Pc. diadema*, *Pc. paccagnellae*, *Pc. porphyreus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>Pseudochromis litus</i> Manawoka																	
2. <i>Pseudochromis litus</i> R4	0.309																
3. <i>Pseudochromis litus</i> Halmahera	0.012	0.309															
4. <i>Pseudochromis litus</i> Banda42m	0.291	0.064	0.291														
5. <i>Pseudochromis rutilus</i> Banda65m	0.300	0.071	0.300	0.018													
6. <i>Pseudochromis litus</i> Misool65m	0.309	0.012	0.309	0.064	0.071												
7. <i>Pseudochromis rutilus</i> Bali77m	0.310	0.177	0.329	0.203	0.194	0.177											
8. <i>Pseudochromis andamanensis</i> Myanmar	0.273	0.320	0.265	0.319	0.319	0.320	0.347										
9. <i>Pseudochromis andamanensis</i> Bali	0.291	0.310	0.282	0.310	0.310	0.310	0.337	0.025									
10. <i>Pseudochromis ransonneti</i> Brunei	0.459	0.416	0.471	0.395	0.395	0.395	0.396	0.357	0.347								
11. <i>Pseudochromis coccinicauda</i> Myanmar	0.649	0.533	0.649	0.562	0.562	0.533	0.562	0.569	0.569	0.582							
12. <i>Pictichromis paccagnellae</i> Banda35m	0.460	0.461	0.482	0.451	0.451	0.473	0.439	0.386	0.396	0.313	0.606						
13. <i>Pictichromis porphyreus</i> Brunei01	0.448	0.417	0.448	0.429	0.429	0.428	0.429	0.386	0.396	0.276	0.619	0.104					
14. <i>Pictichromis porphyreus</i> Brunei02	0.448	0.417	0.448	0.429	0.429	0.428	0.429	0.386	0.396	0.276	0.619	0.104	0.000				
15. <i>Pictichromis diadema</i> Palawan	0.438	0.406	0.438	0.417	0.417	0.417	0.417	0.396	0.407	0.295	0.603	0.104	0.012	0.012			
16. <i>Pictichromis diadema</i> Brunei01	0.470	0.439	0.470	0.452	0.452	0.451	0.452	0.407	0.417	0.305	0.651	0.097	0.018	0.018	0.018		
17. <i>Pictichromis diadema</i> Brunei02	0.470	0.439	0.470	0.452	0.452	0.451	0.452	0.407	0.417	0.305	0.651	0.097	0.018	0.018	0.018	0.000	

Tabel 1. Analisis Jarak Genetik antar spesies dari lokus Control Region.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>Pseudochromis litus</i> Manawoka																		
2. <i>Pseudochromis litus</i> R4	0.017																	
3. <i>Pseudochromis litus</i> Halmahera	0.000	0.017																
4. <i>Pseudochromis litus</i> Banda42m	0.015	0.002	0.015															
5. <i>Pseudochromis rutilus</i> Banda65m	0.015	0.002	0.015	0.000														
6. <i>Pseudochromis litus</i> Misool65m	0.017	0.000	0.017	0.002	0.002													
7. <i>Pseudochromis ransonneti</i> Brunei01	0.138	0.132	0.138	0.130	0.130	0.132												
8. <i>Pseudochromis ransonneti</i> Brunei02	0.136	0.134	0.136	0.132	0.132	0.134	0.002											
9. <i>Pseudochromis andamanensis</i> Myanmar	0.081	0.081	0.081	0.079	0.079	0.081	0.134	0.136										
10. <i>Pseudochromis coccinicauda</i> Myanmar	0.106	0.112	0.106	0.110	0.110	0.112	0.154	0.152	0.115									
11. <i>Pseudochromis andamanensis</i> Bali	0.077	0.081	0.077	0.079	0.079	0.081	0.134	0.131	0.004	0.115								
12. <i>Pictichromis porphyreus</i> Fakfak	0.115	0.117	0.115	0.119	0.119	0.117	0.166	0.164	0.119	0.105	0.119							
13. <i>Pictichromis paccagnellae</i> Banda35m	0.115	0.117	0.115	0.119	0.119	0.117	0.166	0.164	0.119	0.105	0.119	0.000						
14. <i>Pictichromis porphyreus</i> Brunei	0.119	0.117	0.119	0.119	0.119	0.117	0.159	0.161	0.113	0.107	0.117	0.009	0.009					
15. <i>Pictichromis diadema</i> Palawan	0.119	0.117	0.119	0.119	0.119	0.117	0.159	0.161	0.113	0.107	0.117	0.009	0.009	0.000				
16. <i>Pictichromis paccagnellae</i> Banda	0.115	0.117	0.115	0.119	0.119	0.117	0.166	0.164	0.119	0.105	0.119	0.000	0.000	0.009	0.009			
17. <i>Pictichromis diadema</i> Brunei	0.119	0.117	0.119	0.119	0.119	0.117	0.159	0.161	0.113	0.107	0.117	0.009	0.009	0.000	0.000	0.009		
18. <i>Pseudochromis rutilus</i> Bali77m	0.021	0.024	0.021	0.023	0.023	0.024	0.127	0.129	0.072	0.095	0.072	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	

Tabel 2. Analisis Jarak Genetik antar spesies dari lokus 16S.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa hubungan filogenetik ikan *Pseudochromis* dan *Pictichromis* terbagi dalam lima clade dengan jarak genetik terdekat 0% dan jarak genetik terjauh 16,6%. Perbedaan kedalaman dan warna pada ikan tersebut tidak terlalu signifikan sebagai petunjuk dalam menentukan spesies baru.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada segenap staf Indonesian Biodiversity Research Center : Bapak Paul Barber, Bapak Garry Allen, Bapak Ngurah Mahardika, Bapak Mark Erdmann, Michele Webber, Bapak Aji, Ibu Dita Cahyani, Ibu Dian, Bapak Andreanus, Bapak Ahmad, Bapak Naren, Ibu Nana dan Ibu Asa yang telah membimbing dalam melakukan penelitian di bidang genetika molekuler.

Daftar Pustaka

- Allen, G.R. 2007. Conservation Hotspots of Biodiversity and Endemism for Indo-Pacific Coral Reef Fishes. *Aquat. Conserv.*, 18:541–556.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular Marker, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall. USA.
- Baldwin, C.C., C.I. Castillo, L.A. Weigt, B.C. Victor. 2011. Seven New Species within Western Atlantic *Starksia atlantica*, *S. lepicoelia*, and *S. sluiteri* (Teleostei, Labrisomidae), with comments on congruence of DNA Barcodes and Species. *ZooKeys*, 79:21-72.
- Barber, P.H., M.V. Erdmann and S.R. Palumbi. 2006. Comparative Phylogeography of Three Codistributed Stomatopods: Origins and Timing of Regional Lineage Diversification in The Coral Triangle. *Evolution*, 60:1825–1839.
- Crandall E.D., M.A. Frey, R.K. Grosberg and P.H. Barber. 2008. Contrasting Demographic History and Phylogeographical Patterns in Two Indo-Pacific Gastropods. *Mol. Ecol.*, 17:611–626.
- DeBoer, T.S., M.D. Subia, Ambariyanto, M.V. Erdmann, K. Kovitvongsa and P.H. Barber. 2008. Phylogeography and Limited Genetic Connectivity in The Endangered Boring Giant Clam Across the Coral Triangle. *Conserv. Biol.*, 22:1255–1266.
- Gill, A.C. & Randall, J.E. (1998) Five new species of the dottyback genus *Pseudochromis* from Indonesia (Teleostei: Pseudochromidae). *Revue française d'Aquariologie Herpétologie*, 25, 17–26.
- Hidayat, T. dan Pancoro, A. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Perannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetika Anggrek. *J. Agro. Biogen.*, 4(1): 35-40.
- Hyde, J.R., C.A. Kimbrell, J.E. Budrick, E.A. Lynn and R.D. Vetter. 2008. Cryptic Speciation in The Vermilion Rockfish (*Sebastes miniatus*) and The Role of Bathymetry in The Speciation Process. *Mol. Ecol.*, 17:1122–1136.
- Lee, W.J., W.H. Howell and T.D. Kocher. 1995. Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control Regions. *J. Mol. Evol.*, 41:54–66.
- Liu, W, A. Lathrop, J. Fu, D. Yang dan R. W. Murphy. 2000. Phylogeny of East Asian

Bufonids Inferred from Mitochondrial DNA Sequences (Anura: Amphibia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(3): 423-435.

Mathews, L.M. 2006. Cryptic Biodiversity and Phylogeographical Patterns in a Snapping Shrimp Species Complex. *Mol. Ecol.*, 15:4049–4063.

Mayr, E. 1970. *Population Species and Evolution*. Harvard University Press. England.

McCartney, M.A., J. Acevedo, C. Heredia, C. Rico, B. Quenoville, E. Bermingham and W.O. Mcmillan. 2003. Genetic Mosaic in a Marine Species Flock. *Mol. Ecol.*, 12:2963–2973.

Tamura K, D Peterson, Peterson N, Stecher G, M Nei, dan Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Genetics Evolusioner Analisis menggunakan Maximum Likelihood, Jarak Evolutionary, dan Metode maximum parsimony. [Biologi Molekuler dan Evolusi](#) 28: 2.731-2.739.

Tjong, D. H., M. Matseu, M. Kuramoto, D. M. Belabut, Y. H. Sen, M. Nishioka and M. Sumida. 2007. Morphological Divergence, Reproductive Isolating Mechanism and Molecular Phylogenetic Relationship, Among Indonesia, Malaysia, and Japan Populations of the *Fejervaria limnocharis* Complex (Anura, Ranidae). *Zoological Science* 24: 1197-1212.

Walsh, P. S., D. A. Metzger, & R. Higuchi. 1991. Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR Based Typing From Forensic Material. *Biotechniques* 10: 506-513.